

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720081152542

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

氢酶- Cr_2O_3 - TiO_2 复合物催化光解水制氢

Photocatalytic Hydrogen Production by Splitting water
with Cr_2O_3 - TiO_2 -hydrogenase complex

倪恒旺

指导教师姓名: 龙 敏 南 教 授

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2011 年 05 月

论文答辩时间: 2011 年 06 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要	1
Abstract.....	2
第 1 章前言	4
1.1 光解水产氢.....	5
1.1.1 光解水产氢的目前应用和缺陷	5
1.1.2 光解水产氢的在能源领域的应用前景.....	6
1.1.3 TiO ₂ 光催化的机理.....	7
1.1.4 TiO ₂ 吸收光谱向可见光扩展	9
1.1.5 TiO ₂ 纳米管的制备、形成机理及改性	14
1.2 氢酶	19
1.2.1 氢酶的结构	19
1.2.2 氢酶的氧化还原状态和催化机理.....	21
1.3 本论文研究的目的和内容	23
第 2 章 Cr ₂ O ₃ -TiO ₂ 吸附氢酶及产氢实验.....	25
2.1 材料与方法.....	25
2.1.1 实验菌株与材料	25
2.1.2 主要药品及试剂	25
2.1.3 培养基	25
2.1.4 主要仪器.....	25
2.1.5 实验方法.....	26
2.2 结果与分析.....	32
2.2.1 Cr ₂ O ₃ -TiO ₂ 的表征分析.....	32
2.2.2 Cr ₂ O ₃ -TiO ₂ 和氢酶的吸附条件研究	33
2.2.3 耦合制氢实验	39
2.3 讨论	41

第 3 章 TiO₂ 纳米管固定克雷伯氏菌氢酶光解水制氢研究	42
3.1 实验材料	42
3.1.1 实验菌株与材料	42
3.1.2 主要药品及试剂	42
3.1.3 培养基	42
3.1.4 主要仪器	42
3.1.5 实验方法	43
3.2 结果与分析	47
3.2.1 纳米管 XRD 的分析	47
3.2.2 吸附时间对纳米管固定蛋白量的影响	48
3.2.3 不同光照比例下，负载氢酶纳米管的紫外光产氢效率比较	48
3.2.4 负载氢酶量不同的纳米管的紫外产氢效率比较	49
3.2.5 不同电解液下，负载氢酶纳米管的紫外光产氢效率比较	50
3.2.6 不同外加电压下，负载氢酶纳米管的紫外光产氢效率比较	50
3.2.7 正交试验	51
3.2.8 不同反应体系的紫外光产氢效率比较	53
3.3 讨论	54
结论与展望	55
参考文献	57

Catalogue

Abstract.....	1
Chapter 1 Introduction.....	4
1.1 Photocatalytic hydrogen production.....	5
1.1.1 Applications and defects	5
1.1.2 Application prospect in the energy field	6
1.1.3 Mechanism of photocatalytic water splitting.....	7
1.1.4 Expanding absorption Spectrometry	9
1.1.5 Preparing、forming mechanism and modifying of ATTE	14
1. 2 Hydrogenase	19
1.2.1 Structure of Hydrogenase	19
1.2.2 Redox state and Catalytic mechanism of hydrogenase	21
1.3 Content and purpose of this research	23
Chapter 2 Study for the absorption and H₂ photo-production	
.....	25
2.1 Materials and methods.....	25
2.1.1 Strains and Materials	25
2.1.2 Main reagents	25
2.1.3 Main media	25
2.1.4 Main instruments	25
2.1.5 Methods of experiments.....	26
2.2 Results and analysis	32
2.2.1 Characterization of Cr ₂ O ₃ -TiO ₂	32
2.2.2 Condition optimizing of adsorption	33
2.2.3 H ₂ production by Cr ₂ O ₃ -TiO ₂ -hydrogenase	39
2.3 Discussion	41

Chapter 3 Photocatalytic hydrogen production of enzyme immobilized ATTE	42
3.1 Materials	42
3.1.1 Strains and Materials	42
3.1.2 Main reagents	42
3.1.3 Main media	42
3.1.4 Main instruments	42
3.1.5 Methods of experiments	43
3.2 Results and analysis	47
3.2.1 XRD map of ATTE	47
3.2.2 Influence of time	48
3.2.3 influence of illumination proportion	48
3.2.4 The influence of enzyme amount	49
3.2.5 The influence of different electrolytes	50
3.2.6 The influence of different external voltages	50
3.2.7 Orthogonal test for the optimal conditions	51
3.2.8 H ₂ Photo-production in different suspensions systems	53
3.3 Discussion	54
Conclusion and prospect	55
Reference	57

摘 要

本试验研究了 Cr₂O₃-TiO₂-氢酶复合体利用可见光催化光解水产氢。以钛酸四丁酯和重铬酸铵为原料,采用溶胶凝胶法制备了 Cr₂O₃-TiO₂,利用浸渍吸附法将产酸克雷伯氏菌氢酶与 Cr₂O₃-TiO₂ 藕联。研究了搅拌速率、pH、温度等条件对 Cr₂O₃-TiO₂ 吸附氢酶的影响。结果表明 Cr₂O₃-TiO₂ 在 270 nm、440 nm 和 600 nm 附近有明显的吸收峰。Cr₂O₃-TiO₂ 吸附氢酶的最佳条件为: 温度 37 °C, pH 7.0, 搅拌速率 100 rpm, 该条件下氢酶的吸附率达到 80%以上。在氢酶负载量为 10% (W/W)、60 w 白炽灯光源光照度条件下, Cr₂O₃-TiO₂-氢酶催化光解水产氢速率为 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, 是 Cr₂O₃-TiO₂ 催化光解水产氢速率 (3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) 的 3.33 倍, 反应体系中加入终浓度为 0.05 mmol/L 甲基紫晶 (methyl viologen, MV) 及 0.05 mmol/L 连二亚硫酸钠 (Na₂S₂O₃) 可显著提高 Cr₂O₃-TiO₂-氢酶光催化产氢速率, 达 110 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ 。在相同条件下, P25 型 TiO₂ 仅有微量氢产生。本试验结果表明 Cr₂O₃-TiO₂ 能利用可见光光解水产氢, 氢酶与 Cr₂O₃-TiO₂ 藕联可显著提高可见光光解水产氢活性。

采用阳极氧化法制备 TiO₂ 纳米管, 将其作为电解槽的两极, 简称“ATTE” (1.4 cm×4.5 cm), 利用浸渍吸附法将产酸克雷伯氏菌氢酶固定化在阴极 ATTE。研究了光照比例、外加电压、KOH 浓度等因素对负载氢酶的 ATTE 电解法紫外光解水制氢效率的影响, 结果表明 531 μg 为 ATTE 最佳氢酶负载量。负载氢酶的 ATTE 的最佳紫外光光解水的条件为: 光照比例为 1、外加电压为 1.3 V、1.0 mol/L KOH 为电解液。以超净工作台的紫外灯为光源的情况下, 最佳条件下, 负载 531 μg 氢酶的 ATTE 2.5 h 内的产氢量为 1.55 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$, 而未负载氢酶的 ATTE 组和氢酶组 2.5 h 内的产氢量和为 0.95 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 。本试验结果表明负载氢酶的 ATTE 可显著提高 TiO₂ 紫外光光解水产氢活性。

关键词: 产酸克雷伯氏菌; 氢酶; Cr₂O₃-TiO₂; TiO₂ 纳米管; 光解水产氢

Abstract

This study investigated photocatalytic hydrogen production by splitting water using hydrogenase loaded with Cr₂O₃-TiO₂. The light absorption peaks of Cr₂O₃-TiO₂ appeared at 440 nm and 600 nm in visible light region, and at 270 nm in UV light region. The optimum couple conditions for the hydrogenase and Cr₂O₃-TiO₂ were obtained as: temperature 37 °C, pH 7.0 and 100 rpm, with the adsorption rate of 80%. When hydrogenase loading was 10% (W/W), the hydrogen production rate of Cr₂O₃-TiO₂-hydrogenase complex was 3.33 times higher than that of Cr₂O₃-TiO₂ only (3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), which was 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. When the methyl viologen (MV, 0.05 mmol/L) and Na₂S₂O₃ (0.05 mmol/L) were added into the reaction system, the hydrogen production rate catalyzed by Cr₂O₃-TiO₂-hydrogenase complex was suddenly increased to 110 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. Only trace amount of hydrogen was detected when P25 TiO₂ was used as catalysts. The results showed that Cr₂O₃-TiO₂ was a good candidate catalyst for hydrogen production by splitting water with visible light, and loading with hydrogenase could increase the photocatalytic hydrogen production significantly.

An anodized tubular titania (TiO₂) electrode (ATTE, 1.4 cm×4.5 cm) is prepared and utilized as both a photoanode and a cathode in a photoelectrochemical system designed to split water into hydrogen. The optimum amount of hydrogenase immobilized ATTE was 531 μg . The optimum hydrogen production conditions for hydrogenase immobilized ATTE were obtained as: illumination proportion of 1.0, external bias of 1.5 V and 1.0 mol/L KOH. In optimum conditions, the hydrogen yield was 1.55 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ during 2.5 h. However, in the same conditions, the hydrogen yield of ATTE without loading was 531 μg hydrogenase was 0.95 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$, less than the value (1.55 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$) of 531 μg hydrogenase immobilized

ATTE. The results showed that hydrogenase immobilized ATTE was a good choice for hydrogen production by splitting water with ultra-violet light, and loading with hydrogenase could increase the photocatalytic hydrogen production significantly.

Key word: *Klebsiella oxytoca*HP 1; hydrogenase; Cr₂O₃-TiO₂; ATTE; photocatalytic hydrogen production

第1章 前言

能源亦称能量资源或能源资源，为人类的生产和生活提供各种能力和动力的物质资源，是国民经济的重要物质基础，未来国家命运取决于能源的掌控。21世纪以来，经济发展和人口增长的速度、规模空前，世界一次能源消费量不断攀升，而且能源消费的增长模式不尽相同，人类对能源的需求量日益增加，加之化石燃料的天然储量的日益枯竭，以及燃烧化石燃料排放的废气污染环境，使得本世纪的能源面临巨大挑战^[1]。

据2004年世界能源统计年鉴的最新数据，世界石油总储量为1.5万亿桶，仅能够生产使用40多年；全球煤炭储藏量1万亿吨仅够开采200多年。而燃烧化石能源生成大量的CO₂、SO₂等气体又将加重地球的温室效应，引发严重的环境问题^[2]。一直以来，煤炭、石油等矿物燃料的广泛使用，严重污染了全球自然环境，破坏了人类赖以生存的基础，人类一直承受着环境污染造成的健康损失；而且矿物燃料是有限，会因过度开采而枯竭。开发新型清洁能源替代型的开发与应用是化石能源已成大势所趋。氢是宇宙间最简单同时也是最为丰富的元素，其无色、无嗅、无毒的特性而被认为是理想的清洁能源，已引起人们的广泛重视。有科学家预测，氢能是未来能源结构中最为重要的组成部分之一，其优异的使用性能必定使其在未来能源格局中发挥重要的作用。因此，开发可再生的清洁能源成为保持世界经济可持续发展的必然选择^[3]。

氢的能量密度很高，每克的热值高达 1.4×10^4 J，约为同质量石油热值的 3 倍^[4]，是同质量甲烷热值的 2.3 倍；氢是一种十分清洁的能源，它燃烧后只生成水，能够实现真正的“零排放”^[5]；氢的密度很小，能压缩在特制的钢瓶中，其单位运输成本较小，并能快速释放，这样，在运输和使用上比较方便。除了作为优异的能源外，氢也是工业上一种必不可少的原材料^[6]。可以用氢制成燃料电池也可用氢发电，还可以采用燃料电池和氢气-蒸汽联合的联合循环发电来利用氢，其能量转换效率远远超过现有的煤的火力发电效率。另外，氢气还有着更为广泛的用途，如用于氢化工艺中生产低分子量饱和化合物，生产氨、盐酸和甲醇，提炼金属矿，作为

防腐防氧化的除氧剂、火箭发动机的燃料、发电机的制冷剂等，液氢还可用于低温及超导工业。人们发明了许多工艺制取氢，例如，热化学分解水、电解水、光解水、热解水、和热催化重整、热解、气化以及对含氢化合物进行汽化等^[7-9]，90%以上的氢气来自于天然气、轻油馏分的气化重整工艺，电解水、气化煤和重整甲烷也是工业上常用的方法^[9]。这些方法都是以化石燃料为能源，不仅成本高昂，而且会造成大量的能源消耗和环境污染，不能达到新能源节能、环保的要求。

目前较为清洁、节能的制氢方法主要有两大类：生物制氢和半导体光解水。

1.1 光解水制氢

1.1.1 半解水制氢的目前应用和缺陷

1972 年, Fujishima 和 Honda 发现了 n 型 TiO₂ 电极和金电极组成的电池中，在紫外光的照射的条件下，可持续发生水的裂解反应并生成氢气，从此，开始半导体制氢的新纪元^[10]。多相光催化技术主要应用于用可见光或紫光照射半导体材料从而破坏有机污染物结构，达到消除污染的目的。目前，几乎所有有机污染物在水中均可以用光催化氧化法进行分解，该技术在消除气相和液相中机污染物方面得到广泛的应用。目前，人们已研究了 ZnO、ZnS、MoO₃、SrTiO₃、WO₃、Fe₂O₃、CdS、TiO₂ 等多种半导体光催化料，研究表明，TiO₂ 的优点是：光照后不发生光化学腐蚀，化学性质相对稳定，对生物无毒性；耐酸碱性好，资源丰富，且能隙较大，产生光生电子和空穴的电势电位差大，有很强的还原性和氧化性，因此，TiO₂ 光催化技术越来越被人们重视^[11]。自上世纪末以来，以 TiO₂ 作为催化材料的催化技术取得了较大的进展，特别是在环保领域得到广泛的应用，被看作是一种极具潜力的染物物深度处理技术^[12]，现阶段光催化该技术的研主要仍停留在实验室小型反应系统，在理论创新和规模化应用等方面还有许多工作需要进一步去做，以期早日实现其商业化。可以预见，TiO₂ 光催化技术具有相当商业价值和环保价值的应用前景，加强对 TiO₂ 光催化技术的研究对废水处理，环境保护，节约能源以及经济的可持续发展都具有重大意义^[13]。随着纳米 TiO₂ 研究的不断深入，纳米 TiO₂ 光催化技术必将在环保、

能源、工业等各个社会领域发挥越来越重要的作用。几十年来，光催化技术的处理效率始终难以商业化和规模化应用的水平，主要是因为该技术存在诸多技术难题：

(1) TiO₂ 半导体只能吸收紫外光区的光能，不能利用可见光，仅能利用太阳能光强的 4%；

(2) 悬浮相 TiO₂ 粉末光催化剂存在回收难的问题，难以实现二次利用，增加了应用光催化技术的成本，限制了光催化技术的广泛应用；

(3) 光生电子和空穴的复合率高，抑制了电子参加其他的化学反应，导致催化效果不理想；

(4) 光反应器的设计要考虑的因素繁杂，如光催化剂分布、光照强度等因素，技术要求高，增加了实际应用中的成本；

因此，解决光催化技术中存在的这些技术难题问题，是使其商业化和规模化应用的关键。目前，大量的研究集中在对 TiO₂ 进行改性，光反应器的设计与改进，光催化技术与其他处理技术的组合等方面^[14]。

1.1.2 半导体制氢的在能源领域的应用前景

目前，TiO₂光催化技术主要应用在降解有机物污染领域，其在光解水制氢方面，也有较多的研究，如1988年Nikandrov^[15]等将大肠杆菌的氢酶结合在20倍质量的TiO₂粉末的表面进行联合光解水产氢研究，结果表明，结合在TiO₂粉末表面后，氢酶的效率是未结合于半导体表面氢酶的10倍。Sanghyun等^[16]将制备了TiO₂纳米管作为电解的两个电极，简称“ATTE”，将氢酶负载于负极ATTE的纳米管内或表面进行了光解水产氢研究，结果表明负载于纳米管的氢酶暴露于空气中三周后，酶活仅损失15%，且其产氢反应过程中速率较稳定。

可以预见，TiO₂光催化技术在能源领域具有相当价值和有人的应用前景，加强对TiO₂光催化技术的研究，促使其吸收光谱向可见光扩展，提高其产氢效率、提高TiO₂粉末光催化剂的回收率将有利于人类解决日益严重的能源危机和环境危机。相信在不久的将TiO₂光催化制氢将得到商业化和规模化的应用，为人类的经济发展、社会稳定发挥重要作用。

1.1.3 TiO₂光催化的机理

纳米级二氧化钛有二种晶体结构，即：锐钛矿型和金红石型。二种晶体结构的基本单位都是TiO₆八面体，其结构如图1-1所示。它们之间的不同点主要在于八面体的扭曲程度和连接形式。锐钛矿结构的TiO₆八面体仅仅共边，而金红石结构TiO₆八面体不仅共边，而且共顶点。

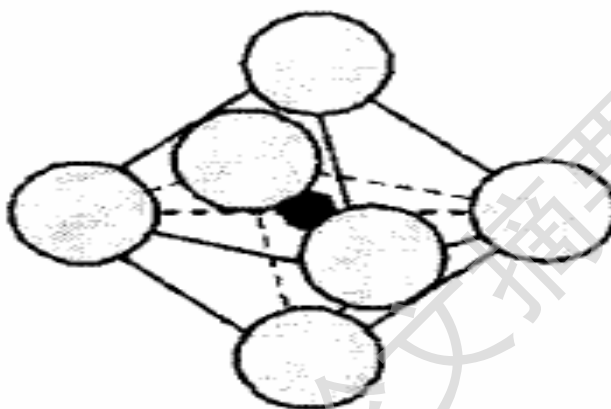


图 1-1 钛氧八面体示意图

Fig.1-1 Ti-O₆ octahedron

与金属不同，半导体的能带是不连续的，其结构(如图1-1)主要由低能价带和高能导带两部分组成，它们之间的还有一段称为禁带的区域。半导体能否作为光催化剂，是由其能带结构结构决定的^[17]。TiO₂的禁带宽度一般为0.2~3.0 eV，是不连续的，它仅能吸收波长小于或等于385 nm的紫外光。

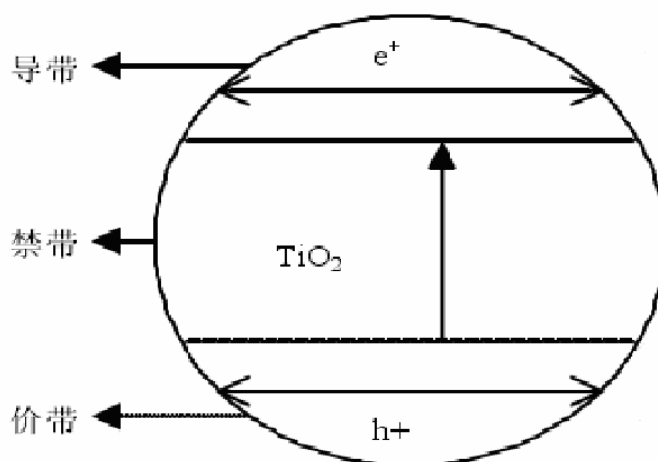


图 1-2 TiO₂ 的半导体能带结构示意图^[18]

Fig.1-2 Configuration of TiO₂

当它受到能量大于禁带宽度光子照射时, 激发产生电子空穴对, 价带上的电子会跃迁到导带, 成为导带电子(e⁻), 同时在价带留下一个空穴(h⁺), 产生的电子和空穴与其表面吸附的O₂·和H₂O等物质发生作用生成的·OH, ·OH具有强氧化能力, 可以氧化许多种有机物, 是光催化氧化反应的主要活性物质^[18] (光催化示意图如图1-3)。从理论上讲, 任何氧化电位大于半导体价带的物质原则上都可以被光生空穴氧化; 同理, 任何还原电位小于导体导带以下的物质, 原则上都可以被光生电子还原。该过程该过程如下式(以TiO₂为例)^[19]:

(1) TiO₂ 受光激发后产生载流子: 光生电子和空穴



在电势差的作用下, 电子空穴会向着相反的方向移动, 电子空穴会被有效的分离, 因此它们有机会迁移到TiO₂粒子的表面, 如果有机物或无机物吸附在TiO₂粒子表面, 那么她们也可能迁移到附着物上, 这种迁移对降解是有利的^[20]。

(2) 电子空穴之间发生复合反应, 并释放热量或光能



该过程与电子空穴的迁移相竞争, 不利于光催化反应。添加一些捕获剂、或构造表面缺陷或其他作用(如电场作用)时, 有利抑制电子和空穴的复合, 增强电子空穴的迁移效应。

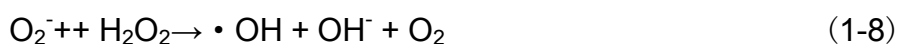
(3) 光生空穴具有极强的氧化能力, 它将吸附在TiO₂粒子表面的OH⁻和H₂O氧化成·OH。

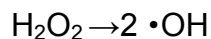


(4) 由导带电子诱发的还原反应



(5) 发生进一步的催化反应





(1-9)

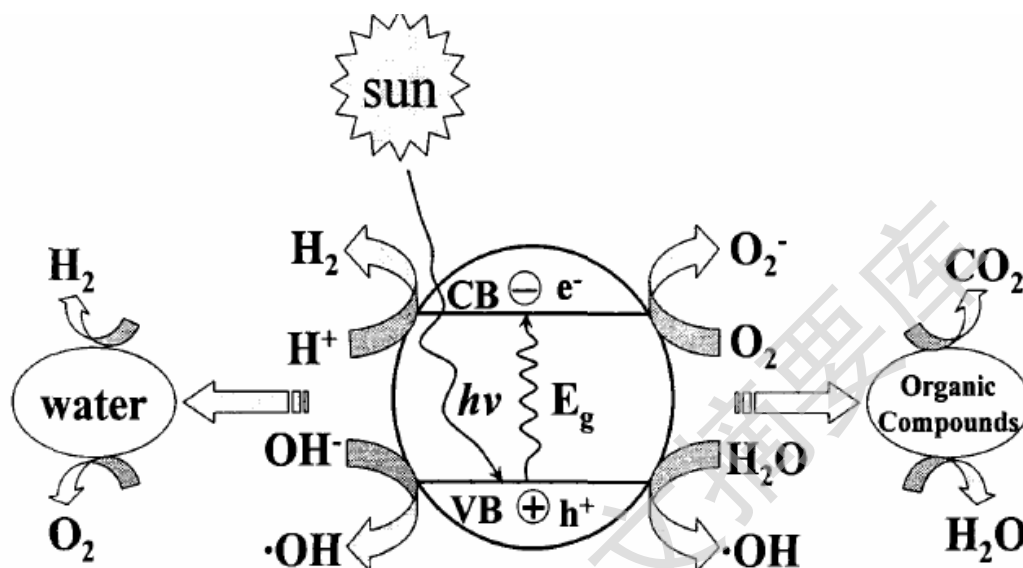
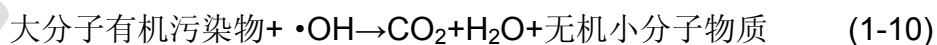
图 1-3 半导体光催化反应原理示意图^[21]

Fig.1-3 Schematic diagram of photocatalytic degradation on semiconductor

(6) $\cdot\text{OH}$ 是光催化反应中最主要的活性物质，是降解污染物质的主要活性剂，它不仅可以氧化大多数有机污染物，甚至可以氧化部分无机污染物，并能将污染物最终降解为 CO_2 、 H_2O 或其他无害物质。而且 $\cdot\text{OH}$ 对反应物几乎没有选择性，所以在光催化反应过程 $\cdot\text{OH}$ 的量是降污效果好坏的关键。



1.1.4 TiO₂ 吸收光谱向可见光扩展

目前，将 TiO₂ 吸收光谱向可见光扩展的方法主要有：金属离子掺杂、贵金属沉积、非金属离子掺杂、半导体复合、离子共掺杂及表面光敏化等。

1.1.4.1 金属离子掺杂

金属离子掺杂是目前研究最多的一种 TiO₂ 可见光响应改性方法。金属离子掺杂入会使 TiO₂ 晶格发生畸变，使得其电子和空穴分离，而且，金属元素存在多化合价，少量金属离子掺杂在 TiO₂ 中，可捕获光生电子和空穴，降低电子与空穴的复合几率。由于金属离子捕获的电子或空穴较容易释放，

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库